

Blue dextran 2000 as a probe for streptococcus mutans dextransucrase assay

著者	古谷 昌裕
発行年	1985-03-23
その他の言語のタイトル	デキストランスクラーゼのブルーデキストラン2000による活性測定 デキストランスクラーゼ ノ ブルー デキストラン 2000 ニ ヨル カッセイ ソクテイ
URL	http://hdl.handle.net/10422/661

氏名・（本籍）	ふる たに まさ ひろ 古 谷 昌 裕 （兵庫県）
学 位 の 種 類	医学博士
学 位 記 番 号	医博第 6 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与年月日	昭和60年 3 月23日
学位論文題目	Blue Dextran 2000 as a Probe for <u>Streptococcus mutans</u> Dextranase Assay (デキストランスクラーゼのブルーデキストラン 2000 による活性 測定)

審 査 委 員	主査 教授	上 田	潔
	副査 教授	佐 藤	匠
	副査 教授	尾 崎	良 克

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

口腔内常在細菌、Streptococcus mutans により菌体外へ分泌されるデキストランスクラーゼは、ショ糖を基質としブドウ糖ポリマーであるデキストランを合成する酵素である。本酵素の最終産物と考えられる粘着性不溶性デキストランは、歯垢形成の大きな要因とされ、歯垢は歯牙う蝕、歯周炎（いわゆる歯槽膿漏）の最大因子であるといわれている。

我々はう蝕、歯周炎の病因を明らかにし、さらにその予防を最終目標として、まず本酵素の反応機構、免疫学的性質等を明らかにするため研究を進めているが、本酵素の精製にあたりその簡便で正確な活性測定法が望まれた。従来、本酵素の活性測定法は二つに大別され、1つは産物であるデキストランを定量するものであり、他方は反応により遊離される果糖を測定するものであるがいずれの方法も煩雑な手段、特殊な設備等を必要とした。我々は有色の水溶性デキストランである Blue Dextran 2000 を Primer dextran として反応系に加えると Blue Dextran が不溶化されることを見出し、このことを利用して新しい活性測定法の開発及びその応用を主たる目的として研究を行なった。

〔方 法〕

100 mM トリス・マレイン酸緩衝液（pH 6.2）、50 mM ショ糖及び 0.06 % Blue Dextran 2000 を含む反応液に Streptococcus mutans OMZ 176 株より部分精製されたデキストランスクラーゼを加え、37℃にて 30～180 分間反応を行なった。煮沸にて反応を止め生成した不溶性

デキストランをフィルター上に集めた。フィルターを 2ml 1N NaOH に浸し超音波にて不溶性 Blue Dextran を再度可溶化させ、この液の吸光度を 620 nm にて測定した。また本反応にて不溶性デキストランにとりこまれたブドウ糖の定量は、上記の基質に ^{14}C -Sucrose (30,000 PM/50 μmol) を用い、同様にフィルター上の不溶性デキストランの放射活性を測定した。一方、全デキストラン量 (不溶性及び可溶性) の測定は、反応液に 4 ml 冷メチルアルコールを加え不溶化させたデキストランをフィルター上に集めその放射活性を測定した。

〔結 果〕

本反応の時間経過を追跡したところ、吸光度 620 nm は、初期の lag の後、直線的増加を示した。この直線部分の速度は加えた酵素量に比例した。吸光度は 0.12 まで直線的に増加し、0.17 でプラトーに達した。またショ糖、Blue Dextran、酵素のいずれが欠如しても吸光度 620 nm の増加は見られなかった。不溶化した Blue Dextran 量、即ち吸光度 620 nm と不溶化したデキストラン中の ^{14}C -Glucose 量にはほぼ比例関係が見られ、不溶性デキストランにとりこまれたブドウ糖は吸光度 0.1 につき 2 μmol であった。本反応の Blue Dextran 不溶化のメカニズム、特に初期 lag の成因についての詳細な情報を得るため、Blue Dextran 濃度を 0.02、0.06、0.1、0.2 % と増加させ実験を行なうと、全デキストラン合成量はいずれの場合でもほぼ等しい勾配で反応開始直後より直線的に増加していくが不溶性デキストラン合成の反応初期の lag は延長した。この lag に相応して可溶性デキストランの合成がみられたが、これは不溶性デキストランの合成に伴って減少した。本菌株以外、他の *Streptococcus* 属 (*S. sanguis*, *S. mutans* AHT, NID R 6715, K 1) も Blue Dextran 不溶化活性を示しこれらの菌株にも応用が可能であることが判明した。

〔考 察〕

本法に従い不溶化 Blue Dextran を定量することによりデキストランスクラーゼの不溶性デキストラン合成活性を従来法より簡便に測定し得た。本法は正確さでは ^{14}C -Sucrose フィルター法に劣るが簡便さで多くの利点を有し、特に多数サンプルのスクリーニングには有用であり感度も充分であった。また、Blue Dextran の様な exogenous dextran は primer として糖鎖に直接結合されることが判明した。従来 exogenous dextran の機能に関しては activator 説と primer 説の両説が提出されており本研究により少なくとも primer であることが示された。また、合成されるデキストランのうち可溶性、不溶性デキストランの割合は、加えた exogenous dextran の量によって変化し、可溶性デキストランが不溶性産物の中間体であることが示唆された。また Blue Dextran と ^{14}C -Sucrose を併用することで不溶化する primer と、新たに取りこまれたブドウ糖量の分別定量が可能となり、反応機構解明への応用も期待された。

〔結 論〕

Streptococcus mutans デキストランスクラーゼの新しい活性測定法を確立した。本法は従来法より簡便であり、酵素の精製やその反応機構の解析、また各種の菌株のデキストランスクラーゼの活性を測定するのにも有用であると思われた。

論文審査の結果の要旨

本研究は歯垢形成の大きな要因と考えられている *Streptococcus mutans* のデキストランスクラーゼの簡便な活性測定法を開発・確立したものである。従来、本酵素の活性測定は、生成デキストランの化学的定量または ^{14}C -sucrose よりデキストランへの ^{14}C -glucose の取込み活性測定により行なわれてきたが、いずれの方法も煩雑であったり、または特殊設備を必要としていた。

著者らは水溶性のブルーデキストラン 2000 が本酵素により不溶化されることを見出し、生成した不溶性デキストランをフィルター上に集め、再度可溶化したのち 620 nm の吸光度を測定する方法を考案した。

測定条件を検討した結果、吸光度 620 nm と不溶性デキストランにとりこまれた ^{14}C -glucose 量には、標準条件においてはほぼ比例関係が見られ、本法を用いることにより正確さでは ^{14}C -sucrose フィルター法に劣るが簡便に多数のサンプルの測定が可能となりその感度も充分であった。またブルーデキストランは不溶性デキストラン生成の primer となることが明らかとなったが、合成されるデキストランのうち可溶性、不溶性デキストランの割合は加えた exogenous dextran の量によって変化し、反応自体の複雑性が示された。

以上の研究は歯垢という歯のう蝕や歯周炎発生の最大の要因が如何にして形成されるかを明らかにするため、デキストランスクラーゼの簡易定量法を考案したものであり、実用性に優れている。またこれに付加して大学院発表会で示されたデキストランスクラーゼの精製とその性状の研究は、十分に酵素化学的評価に値するものであった。

よって本論文は医学博士の学位論文として価値のあるものと認める。